

Aus dem Eidgenössischen Vakzine-Institut, Basel
(Leiter: Dr. U. Kihm)
und dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. R. Wyler)
Arbeit unter der Leitung von Dr. H.K. Müller

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR MAUL- UND KLAUSENSEUCHE :
NACHWEIS VON ANTIKOERPERN GEGEN BIOTECHNOLOGISCH HERGESTELLTES
"VIRUS INFECTION ASSOCIATED" (VIA) ANTIGEN MITTELS ELISA UND
NACHWEIS NEUTRALISIERENDER ANTIKOERPER IN DER JAEHRlich
GEIMPFTEN SCHWEIZERISCHEN RINDERPOPULATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
François Villinger
Tierarzt
von Köniz BE

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. Hans Keller, Korreferent

Zürich 1986

Rieker + Partner AG, Glattbrugg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Eidgenössischen Vakzine-Institut, Basel
(Leiter: Dr. U. Kihm)
und dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. R. Wyler)
Arbeit unter der Leitung von Dr. H.K. Müller

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR MAUL- UND KLAUSEN-
NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN GEGEN BIOTECHNOLOGISCH HERGESTELLTES
"VIRUS INFECTION ASSOCIATED" (VIA) ANTIGEN MITTELS ELISA UND
NACHWEIS NEUTRALISIERENDER ANTIKÖRPER IN DER JÄHRLICH
GEIMPFTEN SCHWEIZERISCHEN RINDERPOPULATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
François Villinger
Tierarzt
von Köniz BE

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. Hans Keller, Korreferent

Zürich 1986

Rieker + Partner AG, Glattbrugg

Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BHK	Baby Hamster Kidney
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ID	Immundiffusionstest
MG	Molekulargewicht
MKS	Maul- und Klauenseuche
MKSV	Maul- und Klauenseuche Virus
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
p.i.	post infectionem
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
SN	Serumneutralisationstest
VIA Ag	Virus Infection Associated Antigen
VIA Ak	Antikörper gegen VIA Ag
VP	Virusprotein

Inhaltsverzeichnis

<u>Einleitung</u>	1
<u>Material und Methoden</u>	4
- Durchführung des ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen VIA Ag	4
- Immundiffusionstest zum Nachweis von Antikörpern gegen VIA Ag	5
- Serumneutralisationstest mit MKSV	5
- Anzahl und Herkunft der Seren	6
- MKS Impfung, Impfstoffe	7
<u>Resultate</u>	9
1) Ak-Nachweis gegen VIA Ag mittels ELISA und ID	9
a) Evaluation des ELISA zum Nachweis von Ak gegen VIA Ag	9
b) Verlauf von Ak Titern gegen VIA Ag bei infizierten Rindern	11
c) Nachweis von Ak Titern gegen VIA Ag in Seren geimpfter Rinder aus der Schweiz	12
2) Neutralisierende Ak der geimpften Schweizer Rinderpopulation	13
a) Zusammenfassung	13
b) Ak Titer bei ungeimpften Kälbern	13
c) Ak Titer bei den geimpften Tieren im Verlauf eines Jahres nach ein- oder mehrmaliger Impfung	13
<u>Diskussion</u>	15
1) Bestimmung von Ak gegen das VIA Ag	15
a) Vergleich der beiden Bestimmungsmethoden ELISA und Immundiffusionstest	15
b) Gründe für die Präsenz von Ak gegen VIA Ag bei nicht infizierten und vakzinierten Tieren	15
c) Ak gegen VIA Ag in Seren von Rindern, die vakziniert oder infiziert wurden	17
2) Neutralisierende Ak gegen MKS Virus in der geimpften schweizerischen Rinderpopulation	18

<u>Zusammenfassung</u>	20
<u>Literaturverzeichnis</u>	21
<u>Verdankung</u>	28
<u>Lebenslauf</u>	30

Einleitung

Die Maul- und Klauenseuche ist eine der wirtschaftlich bedeutendsten Tierseuchen der Welt. Obwohl bei der Bekämpfung während der letzten zwei Jahrzehnte grosse Fortschritte erzielt wurden, tritt diese Krankheit nach wie vor in vielen Teilen der Welt epidemisch auf.

Der Erreger gehört der Familie der Picornaviridae an, und lässt sich in 7 antigenetisch verschiedene Serotypen (O, A, C, Sat 1, 2, 3 und Asia) und über 60 Subtypen aufteilen. Das MKS Virus weist folgende Eigenschaften auf, die eine Bekämpfung und Tilgung der Krankheit erschweren :

Es besitzt ein breites Wirtsspektrum (alle Wiederkäuerarten und Schweine). Es weist eine grosse Mutationsfreudigkeit auf, die sich im Auftreten neuer Varianten, bzw. Subtypen ausdrückt. Eine hohe Kontagiosität ist ihm zu eigen, "kleinste" Virusmengen genügen, um speziell Rinder zu infizieren. Dank seiner hohen Tenazität kann sich das Virus monatelang in der Aussenwelt halten; erst bei Temperaturen über 50° C oder bei pH unter 3,5 oder über 10 wird es vollständig inaktiviert. Die Uebertragung der Krankheit erfolgt über den Nasen-Rachenraum sowohl direkt bei Kontakt mit infizierten Tieren als auch indirekt über die Luft, das Futter oder über den Güter- und Personenverkehr.

Grundsätzlich sind weltweit zwei Bekämpfungs-, bzw Prophylaxe-Strategien möglich :

1) Strenge seuchenpolizeiliche Massnahmen ohne Impfung der Rinder.

Es wird auf die MKS Impfung aller empfänglichen Tiere verzichtet.

Dies bedingt erstens eine strenge Ueberwachung, besonders des Tier-, Fleisch- und Fleischwarenimportes und zweitens die sofortige Isolierung und Keulung der Bestände, in denen eine Infektion auftritt. Dieses Verfahren praktizieren hauptsächlich MKS-freie Länder wie z.B. England, Dänemark, Australien, Kanada und die USA mit Erfolg.

2) Impfung der Rinder.

Die ganze Rinderpopulation wird regelmässig geimpft, wie dies in unseren

Landes seit 1966 geschieht, und eine Tilgung der Seuche zur Folge hatte. Der letzte registrierte Einzelfall stammt aus dem Jahr 1980. Der Vorteil der Immunprophylaxe liegt in der Verhinderung einer mit grossen Tierverlusten einhergehenden Epidemie. Ob jedoch das Virus tatsächlich durch die Impfung eliminiert werden kann, ist Gegenstand einer stetigen Kontrolle. Unter dem Impfschutz könnten sehr wohl früher infizierte Virusträger für eine gewisse Zeit unerkannt bleiben (29), und später Neuausbrüche in nicht geimpften Tiergruppen (Mastkalber, Schweine, Schafe und Ziegen) verursachen.

Sowohl eine Infektion als auch die Impfung induzieren die Bildung von typspezifischen, neutralisierenden Antikörpern. Hohe Titer neutralisierender Ak verleihen einem Tier gegenüber auftretenden Varianten innerhalb eines Serotyps dank Kreuzimmunität einen gewissen Schutz. Deshalb lässt sich der Immunstatus einer Population anhand regelmässiger Leberprüfungen der Ak Titer bei einer repräsentativen Anzahl Tiere abschätzen, aber es lässt sich nicht feststellen, ob die Erzeugung neutralisierender Ak auf eine Impfung oder eine Infektion zurückzuführen ist. Eine Möglichkeit der Differenzierung ist jedoch mit der Untersuchung der Seren auf Ak gegen das "Virus Infection Associated Antigen" (22, 24, 25, 26, 27) gegeben. Beim VIA Antigen handelt es sich um eine RNA induzierte RNA-Polymerase, die erst bei einer Infektion, bzw. Virusreplikation von der Wirtszelle produziert wird (23, 26). Das Protein mit 56,000 MG katalysiert die virale RNA Synthese und weist bei allen Serotypen die gleiche Antigenität auf. Ak gegen VIA Ag werden routinemässig mit einem Immundiffusionstest erfasst (21, 22, 24). Allerdings wird der Wert des VIA Testes in Frage gestellt, da auch die Impfstoffe minimale Mengen von VIA Ag (von der Virusvermehrung her) enthalten können, die bei wiederholten Impfungen Ak zu induzieren (28, 29, 35) vermögen.

Für die vorliegende Arbeit setzten wir uns folgende Ziele :

- Ausarbeitung und Evaluation eines "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA) zur Erfassung von Ak gegen VIA Ag in Rinderseren im Vergleich zum ID. Das benützte VIA Ag wurde gentechnologisch hergestellt, um den Test

auch in nicht streng isolierten Labors durchführen zu können.

- Nachweis von Ak gegen VIA Ag in Seren mehrmals geimpfter einheimischer Rinder.
- Titerbestimmung neutralisierender Ak gegen MKSV bei einer repräsentativen Anzahl von Tieren, um den Immunstatus der schweizerischen Rinderpopulation festzustellen. Dabei wurde die Anzahl Impfungen und die Persistenz der Titer nach der letzten Impfung mitberücksichtigt.

Material und MethodenDurchführung des ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen VIA Ag

Das VIA Ag fiel als Nebenprodukt der biotechnologischen Herstellung des neutralisierende Ak induzierenden Virusproteins 1 (VP1) an (17, 18, 38). Es wurde von der Firma Biogen SA (Genf, Schweiz) in *E. coli* produziert, war zu 30 % rein und wies ein erhöhtes MG von etwa 65.000 auf, da es als Fusionsprotein noch bakterielle Aminosäuresequenzen enthielt. Die Konzentration betrug 1,5 mg Protein pro ml in 6 M Urea gelöst. Wie andere in *E. coli* produzierte Fremdproteine war es schwer löslich (31) und durfte nicht gefroren werden. Als negatives Ag benützten wir ein anderes *E. coli* Fusionsprotein ohne den RNA Polymeraseanteil. Der Test wurde in MicroELISA Platten (Type M 129A, Dynatech Produkte AG, Kloten, Schweiz) durchgeführt. Die optimale Ag Konzentration für das "coating" betrug 0,1 µg Protein/ml in 0,1 M Bikarbonat Puffer, pH 9,6. Es wurden 0,2 ml in jede Delle gegeben, wobei die Reihen jeweils abwechselnd mit negativem und positivem Ag beschickt wurden. Die Platten wurden über Nacht bei 4° C inkubiert, daraufhin entweder mit destilliertem Wasser gespült, getrocknet und unter Vakuum verpackt im Kühlschrank aufbewahrt (bis über 6 Monate) oder zum sofortigem Gebrauch verwendet.

Dann gab man 0,2 ml/Delle PBS-Tween-Ovalbumin pH 7,4 (0,05 % Tween 20, E. Merck, Darmstadt, Deutschland) (0,4 % kristallines Ovalbumin, Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland) zu, um freie Haftstellen des Polyethylens zu blockieren und inkubierte die Platten 1 Stunde bei 25° C, um sie danach 2x mit PBS-Tween zu waschen. Die Testserien wurden 1:100 in PBS-Tween-Ovalbumin verdünnt, je 0,2 ml in 4 Dellen (2 Ag neg., 2 Ag pos) gegeben, und anschliessend die Platten wiederum 1 Stunde bei 25° C inkubiert. Nach 2-maligem Waschen (wie oben) gab man 0,2 ml/Delle Peroxidase-anti-Rind Konjugat (Labor Dr. Bommeli, Bern, Schweiz) 1:300 in PBS-Tween verdünnt zu und inkubierte eine weitere Stunde bei 25° C. Nach wiederum zweimaligem Waschen wurde

0,2 ml Substrat, 2 mM ABTS (2,2'-azinodi-(3-äthylbenzthiazolinsulfonat (6)) diammoniumsalz) Boehringer AG, Mannheim, Deutschland) mit 2,5 mM H_2O_2 in die Dellen eingefüllt. Die Reaktion wurde nicht gestoppt, sondern die Ablesung erfolgte genau nach 30 Minuten bei 25° C in einem Photometer (Wellenlänge 404 nm, Multiskan, Flow Laboratories AG, Baar, Schweiz). Die effektiven "Optischen Dichten" (ΔOD) wurden in einem angeschlossenen Computer (SORD Computer Systems inc., Tokyo, Japan) berechnet. Diese effektive ΔOD ist der Mittelwert von den 2 erhaltenen OD Differenzen : OD (Ag+) - OD (Ag). Der besseren Lesbarkeit halber wurden die Werte in dieser Arbeit mit dem Faktor 1000 multipliziert.

Immundiffusionstest zum Nachweis von Antikörpern gegen VIA Ag

Das VIA Ag sowie die Referenzseren wurden uns vom United State Department of Agriculture, Plum Island Animal Disease Center (Greenport, New York) zur Verfügung gestellt. Dieses VIA Ag wurde aus dem Ueberstand MKSV infizierter Zellkulturen gereinigt (26). Den Test führten wir gemäss Mc Vicar und Suttmöller (24) in 0,8 % Agarose Gel (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur über Nacht durch. Als positive Kontrollen wurden 1 Meerschweinchen- und 2 bovine Referenzseren mitgeführt.

Serumneutralisationstest (SN) mit MKSV

Der Test wurde auf BHK 21 C 13 Zellen in Microtiterplatten (Nunclon, Intermed, Roskilde, Dänemark) unter Verwendung folgender, zellkultur-adaptierter Virusstämme durchgeführt : O1 Lausanne 1965, A5 Eystrup 1951 und C1 Noville 1965.

Die Seren wurden vorerst während 30 Minuten bei 56° C inaktiviert und direkt in den Platten in 3-er Schritten in "Minimal Essential Medium" (Gibco, Grand Island, New York, USA) mit Zusatz von 5 % fetalem Kälberserum verdünnt; es wurden jeweils 4 Dellen pro Verdünnungsstufe angesetzt.

Zu 50 µl Serumverdünnung wurden jeweils 50 µl Virussuspension (100 IE/50µl) zugegeben. Die Platten wurden dann 60 Minuten bei 37° C inkubiert und anschliessend wurden in jede Delle 50 µl BHK 21 Zellen (250.000 Zellen/ml) eingefüllt. Nach 3 Tagen bei 37° C in einem CO₂-Inkubator konnten die Platten abgelesen werden.

Die Berechnung der Titer erfolgte nach der Methode von Spearman und Kaerber. Die angegebenen Titer entsprechen den Serumverdünnungen ohne Viruszugabe. Als Mittelwert wurde der Mediantiter der jeweiligen Gruppen angegeben.

Anzahl und Herkunft der Seren

In Tabelle 1 sind die in der Schweiz (obligatorische jährliche MKS-Impfung) gesammelten Seren und in Tabelle 2 Seren von Rindern aus einem MKS freien Land ohne Impfung (Dänemark) zusammengestellt.

Tab. 1 : Herkunft und Anzahl untersuchter Rinderseren aus der Schweiz von geimpften und nicht geimpften Tieren stammend.

Herkunft der Seren	Anzahl Seren	Geimpfte Tiere	Ungeimpfte Tiere	Entnahme in der Zeit von	Untersuchung auf	
					SN Ak	VIA Ak
Neuenburg	1055	1055 (1)	-	02.84 - 01.85	1055	270
Ostschweiz	1420	1315 (2)	105	10.84 - 01.85	1420	31
Unbestimmt	498	361 (3)	137	10.84 - 01.85	498	1
US Export	225	-	225 (4)	1981 - 1985	225	225
Total	3198	2731	467		3198	527

(1) vakziniert mit Rhône Mérieux Impfstoff, (2) vakziniert mit Wellcome Impfstoff, (3) vakziniert mit unbestimmtem Impfstoff, (4) MKS seronegativ.

Tab. 2 : Seren von dänischen Rindern.

Seren von dänischen Rindern	Anzahl Seren	Untersuchung auf	
		SN Ak	VIA Ak
vor Impfung (1)	50	50	50
nach Impfung (1)	37	37	37
nach Infektion (1)	120	80	120
Andere	257	257	257
Total	461	421	461

(1) Diese Tiere wurden zwecks MKS-Impfstoffkontrollen 1 mal geimpft und anschliessend experimentell im Eidg. Vakzineinstitut, Basel, infiziert.

Ausserdem wurden 10 Menschen-, 24 Schweine-, 7 Hunde- und 7 Katzenseren mittels ELISA und ID auf Ak gegen VIA Ag untersucht.

MKS Impfung, Impfstoffe

Die jährliche MKS Impfung der Rinder erfolgt in der Schweiz jeweils zwischen dem 15. Februar und dem 15. Mai. Seit Jahren werden dazu 3 inaktivierte trivalente (O1, A5 und C1) Impfstoffe verwendet, nämlich :

- Ein von der Firma Rhône Mérieux (Lyon, Frankreich) hergestellter Impfstoff, welcher auf Zungenepithel vermehrtes Virus enthält und der hauptsächlich in der West- und Zentralschweiz Verwendung findet.
- Eine von Wellcome (Impfstoffwerke, Burgwedel, Deutschland) hergestellte Vakzine, welche in suspendierten BHK-Zellen vermehrtes Virus enthält.

Diese kommt eher in der Ostschweiz zur Verwendung.

- Der dritte verwendete Impfstoff, vom Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Brescia (Italia) hergestellt, wird nur im Kanton Tessin angewendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde er nicht berücksichtigt, da der Anteil dieses Impfstoffes an den jährlichen Impfkampagnen gesamtschweizerisch weniger als 1 % ausmacht.

Resultate1) Nachweis von Ak gegen VIA Ag mittels ELISA und IDa) Evaluation des ELISA zum Nachweis von Ak gegen VIA Ag

Um zwischen positiven und negativen Ak Titern gegen VIA Ag diskriminieren zu können, brauchte es Messwerte einer sicher negativen Population. In Tabelle 3 sind die Resultate einer Anzahl Rinderseren aus einem MKS-freien Land (Dänemark) und von ungeimpften Schweizer Tieren (US Export) dargestellt.

Tab. 3 : VIA Ak ELISA : ΔOD -Werte der Seren von sicher ungeimpften und nachgewiesenermassen MKS seronegativen Rindern dänischer und schweizerischer Herkunft.

Seren	ΔOD					
	≤ 100		100 - 200		≥ 200	
	N	%	N	%	N	%
DK 307	240	78	20	7	47	15
CH 225	214	95	7	3	4	2
Total 532	454	85	27	5	51	10

Bemerkenswert war dabei, dass beide Populationen stark abweichende Ergebnisse ergaben. 15 % der Rinderseren aus Danmark wiesen eine ΔOD von ≥ 200 d.h. die OD Differenz war selbst von blossen Auge zu erfassen und wurde als positiv beurteilt. Einige dänische Seren zeigten sogar extrem hohe Werte bis über 1000. Dagegen wiesen nur 2 % der Rinder aus der Schweiz hohe Werte auf. Unter Berücksichtigung der Testvariabilität wurden ΔOD -Werte unter 100 als negativ interpretiert. Der Medianwert beider (schweizerischen und dänischen) Populationen war gleich 0. Seren mit einer ΔOD zwischen 100 und 200 wurden als "nicht interpretierbar" beurteilt.

Bei allen Seren mit einer $\Delta OD \geq 100$ waren im Immundiffusionstest (ID) mit klassischem VIA Ag keine präzipitierenden Ak nachzuweisen. Dagegen reagierten die zwei bovinen Referenzseren des ID relativ schwach im VIA ELISA ($\Delta OD = 175$ resp. 220).

Bei Mensch, Schwein, Hund und Katze konnten mittels ELISA Ak gegen VIA Ag nachgewiesen werden, während dies mit dem ID nicht gelang (Tab. 4). Alle diese Seren waren frei von neutralisierenden Ak gegen MKS.

Tab. 4 : Nachweis von Ak gegen VIA Ag in Menschen-, Schweine-, Hunde- und Katzenseren mittels ELISA und ID.

Spezies	Anzahl Seren	ELISA		ID	
		+	-	+	-
Mensch (1)	10	2	3	0	10
Schwein	24	10	14	0	24
Hund	7	1	6	0	7
Katze	7	1	6	0	7

(1) Die betroffenen Personen wurden mit einem Lebendimpfstoff gegen Poliomyelitis geimpft.

b) Verlauf von Ak Titern gegen VIA Ag bei infizierten Rindern

Abbildung 1 zeigt den Ak Titerverlauf im ELISA von 5 infizierten Rindern sowie das Auftreten präzipitierender anti-VIA Ak im ID und neutralisierender Ak. Die ELISA Ak Titer gegen VIA Ag vor der Infektion variierten wie auch in Tabelle 3 dargestellt stark. 7 bis 10 Tage nach Infektion mit MKS Virus stiegen die Ak Titer gegen VIA Ag aller Tiere steil an. Gleichzeitig traten gegen VIA Ag präzipitierende und Virus neutralisierende Ak auf.

Die ELISA Ak Titer fielen relativ rasch ab, bei Rind Nr 8037 sogar ab 63 Tage p.i. unter die Nachweisgrenze, obwohl bei diesem Tier bis zum Tag +84 (Schlachtung dieser Tiere) im ID anti VIA Ak nachweisbar blieben.

Wie Tabelle 5 zeigt, war nach einmaliger Impfung kein wesentlicher Anstieg der Ak Titer gegen VIA Ag zu beobachten, trotzdem schon vor Vakzination rund 1/5 der Tiere positiv reagierten. Erst nach Infektion zeigten dann etwa 2/3 der Tiere eine Reaktion ($\Delta OD \geq 200$).

Tab. 5 : Verteilung der ELISA ΔOD Werte gegen VIA Ag bei 37 Rindern aus Dänemark, die nach Vakzination experimentell infiziert wurden.

vor Impfung			nach Impfung (1)			nach Infektion (2)		
ΔOD			ΔOD			ΔOD		
≤ 100	100-200	≥ 200	≤ 100	100-200	≥ 200	≤ 100	100-200	≥ 200
26	3	8	23	4	10	13	2	22

(1) Serumentnahme 21 Tage nach einmaliger Impfung, (2) Serumentnahme 6 bis 10 Tage nach Infektion.

c) Nachweis von Ak Titern gegen VIA Ag in Seren geimpfter Rinder aus der Schweiz

Bei 1 - 9 mal geimpften Rindern, denen nur wenige Wochen nach der letzten Impfung Serumproben entnommen wurden, waren bei 7 % der Tiere Ak gegen VIA Ag nachweisbar ($\Delta OD \geq 200$). Bei 10 - 17 mal geimpften Tieren stieg der prozentuale Anteil auf 10 % (Tab. 6). Im Gegensatz dazu wiesen nur 2 % der ungeimpften Tiere im ELISA Ak gegen VIA Ag auf (Tab. 3).

Tab. 6 : Verteilung von VIA Ak Titer bei total 302 geimpften Schweizer Rindern im ELISA und ID in Abhängigkeit von der Anzahl Impfungen und der Serumentnahmedaten.

Anzahl Impfungen	Anzahl Seren	Entnahme Datum	VIA ELISA ΔOD			VIA ID	
			≤ 100	100 - 200	> 200	+	-
1 - 9	220	04.84 - 07.84	181 (83 %)	22 (10 %)	17 (7 %)	1	219
10 - 17	82	02.84 - 01.85	71 (86 %)	3 (4 %)	8 (10 %)	0	82
Total	302		252 (84 %)	25 (8 %)	25 (8 %)	1	301

Nur ein einziges Serum einer Kuh (7 Impfungen, Entnahmedatum April 84) ergab auch eine positive Reaktion im ID.

Zwischen den ELISA VIA Ak positiven Seren ($\Delta OD \geq 200$) und der Höhe ihrer SN Titer war keine Korrelation zu finden d.h. ein hoher ELISA Ak Titer gegen VIA Ag eines Serums implizierte keineswegs hohe Titer neutralisierender Ak.

2) Neutralisierende Ak bei der geimpften Schweizer Rinderpopulation

a) Zusammenfassung

Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 7 (siehe Anhang) zusammengefasst. Die Auswertung berücksichtigt die Anzahl Impfungen, die Serumentnahmepériode und den Virustyp, gegen welchen die Ak gerichtet sind. Zwischen 3 und 4 mal sowie zwischen 5 und mehrmals geimpften Tieren bestanden keine wesentlichen Unterschiede, so dass diese zu je einer Gruppe zusammengefasst wurden.

Es wird jeweils der Mediantiter jeder Gruppe gegen alle drei Serotypen (O, A und C) aufgeführt.

Diese Ergebnisse werden zusätzlich in den Abbildungen 2, 3 und 4 (siehe Anhang) graphisch dargestellt.

b) Ak Titer bei ungeimpften Kälbern

Aus Abbildung 2 ist ersichtlich, dass 5 % (gegen Serotyp A5, C1) bis 15 % (gegen Serotyp O1) der 1984 geborenen ungeimpften Kälber einen maternalen Ak Titer von >1.3 aufwiesen. Dies, obwohl zwischen der letzten Impfung des Muttertieres und der Serumentnahme des Kalbes mindestens 6 Monate vergangen waren.

c) Ak Titer bei den geimpften Tieren im Verlauf eines Jahres nach ein- oder mehrmaliger Impfung

In der Abbildung 3 sind der Prozentsatz der Tiere mit SN Ak Titern und die Titerhöhe nach einmaliger Impfung von Rindern dargestellt. Bereits wenige Monate nach Vakzination wies der grösste Teil der Tiere wieder niedrige oder keine Titer mehr auf, wobei sich die Ak Titer gegen alle 3 untersuchten Serotypen bis Juli und August ähnlich verhielten. Im September - Oktober war gegen Serotyp O1 noch der höchste Ak Titer zu beobachten. Im November - Dezember waren bei allen drei Serotypen 70 % der Seren ohne Ak gegen das M^Y-

Virus. In der Abbildung 4 sind die SN Ak Titer gegen die drei Serotypen während der Zeitdauer eines Jahres nach ein- und mehrmaliger Impfung verglichen. Im Boxplot Verfahren (42) werden hier jeweils der Mediantiter, das 25 und 75 % Quartil sowie die Extremwerte (Titerhöhe und Anzahl Seren) unter und über einer zusätzlichen "Boxenlänge" dargestellt. Es fällt auf, dass sowohl bei einmal wie mehrmals geimpften Tieren, die Ak Titer gegen A5 niedriger ausfielen als gegen O1 und C1, wobei Serotyp O1 die bessere Immunität zu induzieren schien als Serotyp C1. Die Ak Titer waren jeweils im Frühling und Frühsommer kurz nach der Impfung am höchsten. Mit steigender Anzahl Vakzinationen wurden auch höhere Titer beobachtet. Es liessen sich zwischen Herkunft der Seren, bzw. angewandtem Impfstoff (Rhône Merieux oder Wellcome), keine signifikanten Unterschiede in bezug auf Ak Titerhöhe feststellen.

Diskussion

1) Bestimmung von Ak gegen das VIA Ag

a) Vergleich der beiden Bestimmungsmethoden ELISA und Immundiffusionstest

Der ELISA schien in unseren Versuchen der sensitivere Test zu sein. Jedoch können die beiden Nachweismethoden nicht direkt miteinander verglichen werden, da wahrscheinlich verschiedene Populationen von Ak erfasst werden. Im ELISA ist das Antigen gebunden, im ID gelöst. Ausserdem stammen die verwendeten Antigene aus verschiedenen Quellen, für den ELISA kam ein in E. coli hergestelltes Protein und für den ID ein aus dem Ueberstand MKS-Virus infizierter Zellkultur gereinigtes Protein, zur Anwendung. Die Verwendung des biotechnologisch gewonnenen Proteins im ID war wegen dessen Unlöslichkeit nicht möglich. Auch am Animal Virus Research Institute Pirbright, (GB) wird ein ELISA mit natürlichem, gereinigtem VIA Ag zum Nachweis von VIA Ak eingesetzt. Wir schickten deshalb 75 von uns schon untersuchte Seren dänischer Rinder, vor und nach Impfung sowie nach Infektion nach Pirbright. Auch in England fanden sich in den Seren von Tieren vor Impfung, die nie mit dem MKS-Virus in Kontakt kamen, Ak gegen das VIA Ag, dies trotz negativem ID. Allerdings stimmten die Ergebnisse mit den unseren nur zu 60 % überein. Es ist aber zu berücksichtigen, dass in Pirbright eine andere ELISA-Technik (es wurde dort kein negatives Ag mitgeführt) angewandt wurde, und deshalb direkte Vergleiche nur beschränkt möglich sind.

b) Gründe für die Präsenz von Ak gegen VIA Ag bei nicht infizierten und vakzinierten Tieren

Es gibt keine klare Antwort auf die Frage warum im Serum von Tieren, die unseres Wissens nie mit MKS-Virus Antigen in Kontakt kamen, Ak gegen VIA Ag

besonders mittels ELISA, zu finden sind.

Eine MKS-Infektion ist nie auszuschliessen, obschon eine solche Erklärung sehr unwahrscheinlich ist; denn es waren weder Ak gegen VIA Ag im ID noch neutralisierende Ak nachweisbar. Auch unspezifische Reaktionen im ELISA verursacht durch "klebende" Proteine oder unspezifisch haftende Ak könnten zu falsch positiven Ergebnissen führen. Für ein solches Phänomen wurde der Titerverlauf beim Rind Nr. 8041 am 27. Tag vor Infektion sprechen. Bei diesem Tier sank der ΔOD -Wert gegen VIA Ag innert einer Woche von 1000 auf Null (Abb. 1). Beim Tier Nr 8032 war ein Anstieg von 300 auf 1200 festzustellen, und dies innert einer Woche fast 3 Wochen bevor es infiziert wurde.

Es wird weiter beschrieben (6, 7, 39), dass beim Coaten im ELISA Konformationsveränderungen an den Proteinmolekülen erfolgen, so dass vorher "versteckte", nun aber freigelegte Epitope als neue Bindungsstellen für die Ak dienen könnten. Ein solches Phänomen ist möglicherweise für die verschiedenen ELISA-Ergebnisse in Basel und Pirbright wie auch für die "falsch positiven" Resultate, verglichen mit dem ID, verantwortlich.

Eine Rolle hatte auch das biotechnologisch hergestellte Ag spielen können. Es wäre dabei an Konformationsveränderungen (tertiäre Molekülstruktur) des in E. coli synthetisierten Proteins zu denken, weiter an Reaktionen von Ak im Serum mit dem Bakterienprotein, welches das biotechnische VIA Ag als Kontaminante enthielt, wobei dieser Einfluss weitgehend durch das Mitführen des negativen Ag ausgeschaltet sein sollte.

Am plausibelsten erscheint uns jedoch, das Vorhandensein von Ak gegen VIA Ag mit einer durch andere Vertreter der Familie Picornaviridae verursachten Infektion erklärbar zu sein. Es besteht nämlich eine weitgehende Identität von RNA Polymerasen innerhalb dieser Familie (31, 33, 36). Für eine solche Annahme spräche die Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse sowie die festgestellten Unterschiede bei Tieren aus der schweizerischen und der dänischen Rinderpopulation. Die Seuchenlagen in beiden Ländern wären dann in bezug auf eine Picornavirusinfektion verschieden. Wir haben zur weiteren Abklärung dieser Frage zusätzlich Seren von Menschen und anderen Tierarten untersucht. Dabei wiesen Menschen- und Schweineseren am häufigsten Ak gegen VIA Ag auf, was sich durch die erfolgten Revakzinationskampagnen gegen

Poliomyelitis und durch die hohe Durchseuchungsrate der Schweinepopulation mit Enteroviren (41) erklären liesse.

c) Ak gegen VIA Ag in Seren von Rindern, die vakziniert oder infiziert wurden.

Bei der Festlegung des ΔOD Grenzwertes im ELISA stützten wir uns auf die zwei im ID positiven Referenzseren, die niedrige Titer aufwiesen. Es scheint, dass im Blut die präzipitierenden Ak länger persistieren als die ELISA Ak.

Der Ak Titeranstieg gegen VIA Ag im ELISA war nach einer MKS Infektion unbestreitbar, auch bei hohen Ausgangswerten. Ausserdem korrelierte dieser Titeranstieg zeitlich mit dem Auftreten von präzipitierenden Ak.

Die Ak Titer gegen VIA Ag mittels ELISA nachgewiesen, fielen rasch ab, und Ak konnten schon 2 Monate p.i. nicht mehr nachgewiesen werden (Tier Nr. 8037, Abb. 1). Dies beeinträchtigt die Erfassung möglicher Virusinfektionen in einem Bestand nach länger zurückliegender Krankheit. Bedauerlicherweise mussten die 5 infizierten Tiere geschlachtet werden, und der weitere Titerverlauf konnte nicht erfasst werden (Abb. 1). Es ist deshalb unmöglich, anhand dieser Experimente eine Aussage über eine maximale Titerpersistenz zu machen. Aus unseren Ergebnissen geht auch hervor, dass punktuellen Einzeltieruntersuchungen keine Bedeutung zukommt. Erst Bestandes- oder Populationsuntersuchungen haben genügend Aussagekraft, um eine eventuelle Verbreitung einer MKS Infektion beurteilen zu können.

Der ID Test scheint weniger sensitiv, dafür aber spezifischer zu sein als der ELISA (24, 25, 26). Er ist jedoch zeitaufwendiger und die Ag Herstellung kann nur in streng isolierten Laboratorien vor sich gehen.

Der einzige positive ID Befund bei einem schweizerischen Rind führte zur Untersuchung des gesamten Herkunftsbestandes. Der Verdacht auf eine unerkannte MKS Infektion bestätigte sich jedoch nicht; denn kein weiteres Rind dieser Herde (37 Tiere) wies im ID einen Ak Titer gegen VIA Ag auf. Im ELISA hinge-

gen reagierten 7 dieser 37 Tiere positiv. Es ist daher nicht auszuschliessen, dass der positive ID Befund durch die wiederholten (7 maligen) Impfungen induziert wurde, obschon sonst mittels ID keine Ak gegen VIA Ag mehrmals geimpfter Tiere nachzuweisen waren. Dieser Befund steht im Gegensatz zu denen anderer Autoren (28, 29, 35).

Es ist noch darauf hinzuweisen, dass Tiere mit 10 oder mehr Impfungen im ELISA häufiger anti-VIA Ak zeigten als ungeimpfte (10 % resp. 2 %).

2) Neutralisierende Ak gegen MKS Virus in der geimpften schweizerischen Rinderpopulation

Der Bestimmung neutralisierender Ak gegen MKS in einer geimpften Rinderpopulation kommt bei der Erfolgskontrolle der Immunprophylaxe grosse Bedeutung zu, obschon dabei nur die humorale Abwehr berücksichtigt wird. Es bestehen jedoch Korrelationen zwischen Ak Titer und erworbenem Schutz (3, 4, 8, 9, 14, 15). Titer unter 0.70 werden für den MKS SN als unspezifisch d.h. negativ angesehen (9, 14). Die Ak Titer gegen den Serotyp A5 waren etwas niedriger als diejenigen gegen Serotyp O1 und C1, was aber keine Beeinträchtigung des Schutzes bedeutet (Abb. 4, Tab. 7). Aufgrund von Schutzversuchen betrachten wir einen Titer von 1.31 und höher im allgemeinen als genügend für einen Immunschutz. Bei verschiedenen Impfstoffkontrollen im Eidg. Vakzineinstitut waren 7 von 40 Rinder drei Wochen nach einmaliger Vakzination ungenügend gegenüber einer Infektion mit MKS Serotyp A5 geschützt, dabei wies am Tage der Infektion keines dieser Tiere einen Titer >1.07 auf.

Bei den ungeimpften Kälbern (Abb. 2) schienen die maternalen Ak recht lange zu persistieren, wenn berücksichtigt wird, dass zwischen der Blutentnahme der Kälber und der letzten Impfung der Muttertiere 6 bis 23 Monate vergangen sind. Diese Tatsache wirkt sich für unser Land bei Exporttieren nach einem Land mit Implverbot nachteilig aus, da nach den Einfuhrbestimmungen dieser Länder nur seronegative Tiere importiert werden dürfen. Ferner könnten die im Serum präsenten Ak die Immunantwort bei der ersten Impfung abschwächen. Primovakzinierte Rinder stellen eine epidemiologisch wichtige Gruppe dar, denn vom Tierhalter werden sie als "geschützt" angesehen. Ihr SN Ak Titer

fiel aber, wie unsere Untersuchungen zeigen, innert 6 Monaten rasch ab (Abb. 3). Bei einem drohenden Seuchenfall wäre demnach ein beachtlicher Teil der Rinderpopulation (etwa 250 000 Tiere) in der Schweiz ohne gesicherten Schutz gegenüber einer MKSV Infektion.

Hohe Ak Titer waren bei einem grossen Prozentsatz der Rinder bereits in den Monaten März und April zu verzeichnen. Das mag im Hinblick auf die gesetzlich vorgeschriebene Impfperiode vom 15. Februar 15. Mai erstaunen. Doch wird in der Praxis die MKS Impfung meistens in der ersten Hälfte der gesetzlich vorgeschriebenen Periode vorgenommen.

Schon zweimal geimpfte Rinder wiesen im allgemeinen, aufgrund unserer vergleichenden Untersuchungen (Ak-Titer - Schutz) bei der jährlichen Impfstoffkontrolle, einen zufriedenstellenden Ak Titer auf (Abb. 4).

Die Titer mehrmals nachgeimpfter Tiere stiegen mit zunehmender Anzahl Impfungen. Sie waren im Durchschnitt hoch, persistierten und lassen einen guten Schutz unserer Rinderpopulation gegen alle 3 in Europa "heimischen" Virustypen vermuten. Die zum Teil niedrigen Mediantiter neutralisierender Ak gegen Serotyp C1 und A5 in den Monaten September und Oktober lassen sich durch die deutlich kleineren Gruppenzahlen gegenüber den zwei darauffolgenden Periodengruppen erklären (siehe Tab. 7).

Zusammenfassung

Der ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen VIA Antigen, mit gentechnologisch hergestelltem Antigen, ist ein sensitiver, technisch leicht durchzuführender Test, der keine besonderen Sicherheitsmassnahmen erfordert, da bei keinem Schritt der Antigenherstellung infektiöses Virus verwendet wird. Allerdings ist sein Aussagewert für Einzeltieruntersuchungen beschränkt, da er je nach Immunitätslage der untersuchten Rinderpopulation einen hohen Anteil "falsch positiver", wahrscheinlich auf eine Enterovirus Infektion zurückzuführende Werte - in unserem Versuch mit MKS seronegativen dänischen Rindern bis 15 % - ergab. Bei ungeimpften Schweizer Rindern war dieser Anteil mit 2 % bedeutend geringer, unter den geimpften Tieren stieg er bis auf 10 % an. Im ID Test war nur eines (0,3 %) der geimpften Tiere positiv. Der wahre Vorteil des VIA ELISA liegt in seiner absoluten Unbedenklichkeit bezüglich Virusstreuung, was ihn zum prädestinierten diagnostischen Test in MKS freien Ländern macht.

Die Schweizer Rinderpopulation wies im Durchschnitt bereits ab der zweiten Impfung einen genügend hohen Titer neutralisierender Antikörper (Ak) gegen MKS Viren der Typen O1, A5 und C1 auf. Mit steigender Anzahl Impfungen, stiegen die durchschnittlichen Ak Titer und verlangsamte sich ihr Abfallen im Jahresverlauf. Primovakzinisierte Tiere verloren grösstenteils ihren Titer innerhalb 6 Monaten nach der Impfung.

Neugeborene Kälber nahmen über das Kolostrum nachweisbare Mengen neutralisierender Ak auf, die im Blut bis zu einem Jahr persistierten.

Literaturverzeichnis

1. J.G. Van Bakkum.

Neutralising antibodies in the sera of cattle vaccinated against FMD.
Bull. Off. Int. Epizoot. (1959) 51, 591-598.

2. S.M. Golding, R.S. Hedger, P. Talbot and J. Watson.

Radial immunodiffusion and serum neutralisation techniques for the assay
of antibodies to swine vesicular disease.
Res. Vet. Sci. (1976) 20, 142-147.

3. J. Terré, C. Stellmann, A. Brun, H. Fabre et J. Fontaine.

Contrôle d'activité du vaccin antiaphteux sur bovins : méthodes
quantitatives d'extinction antigénique.
Dev. Biol. Stand. (1977) 35, 357-367.

4. T.W.F. Pay and M.S. Parker.

Some statistical and experimental design problems in the assessment of FMD
vaccine potency.
Dev. Biol. Stand. (1977) 35, 369-383.

5. J.C. Booth, M.M. Rweyemamu and T.W.F. Pay.

Dose - response relationships in a microneutralisation test for FMD virus.
J. Hyg. (1978) 80, 31-40.

6. M. Lombard and R. Piroird.

Titration of FMD antibodies in cattle sera : comparative study of two
methods, seroneutralisation on cells and ELISA.
Report of the Session of the European Commission for the Control of FMD
(1981, Tübingen) 72.

7. M. Lombard and H.G. Petermann.

Korrelation zwischen dem ELISA-Test und der Seroneutralisation zur Titrierung MKS-Virus-neutralisierender Antikörper im Serum von Kontroll-Rindern.

Tierärztl. Umsch. (1982) 37, 354-356.

8. R. Ahl, R.J. Lorenz and G. Wittmann.

A trial to estimate the potency of FMD vaccines by means of serum antibody assays with sera from groups of vaccinated cattle.

Report of the Session of the European Commission for the Control of FMD (1983, Lelystad) 56-58.

9. M. Amadori, S. Barei, M. Bugnetti and G.F. Panina.

Correlation between antibody level and response to challenge in vaccinated cattle. Preliminary results for "O" Type.

Report of the Session of the European Commission for the Control of FMD (1984, Brescia) 52-55.

10. M.M. Rweyemamu, L. Black, A. Boge, A.C. Thorne and G.M. Terry.

The relationship between the 140 S antigen dose in aqueous FMD vaccines and the serum antibody response of cattle.

J. Biol. Stand. (1984) 12, 112-120.

11. T.W.F. Pav.

Factors influencing the performance of FMD vaccines under field conditions.

In : Edward Kurstak Ed, Applied Virology, Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London, (1984) 73-86.

12. M.M. Rweyemamu.

Antigenic variation in FMD : studies based on the virus neutralisation reaction.

J. Biol. Stand. (1984) 12, 323-337.

13. M.M. Rweyemamu, E. Ouldrige, M. Head and R. Ferrari.

The effect of antiserum quality on strain specificity assessment of FMD virus by the neutralisation reaction.

J. Biol. Stand. (1984) 12, 295-303.

14. V.M. Astudillo and A.J.M. Da Silva.

Classification : Optimum cut off screen value for FMD immunity evaluation. Prev. Vet. Med. (1984) 2, 791-799.

15. L. Black, M.J. Francis, M.M. Rweyemamu, D. Umehara and A. Boge.

The relationship between serum antibody titres and protection from FMD in pigs after oil emulsion vaccination.

J. Biol. Stand. (1984) 12, 379-389.

16. N.P. Ferris and A.I. Donaldson.

Serological response of guinea pigs to inactivated 146 S antigens of FMD virus after single or repeated inoculations.

Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. (1984) 313, 563-574.

17. S. Forss, K. Strebel, E. Beck and H. Schaller.

Nucleotide sequence and genome organization of FMD virus.

Nucl. Acid. Res. (1984) 12, 6587-6602.

18. H.M. Geysen, R.B. Melen and S.J. Barteling.

Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 3998-4002.

19. N.P. Ferris, A.I. Donaldson, I.T.R. Barnett and R.W. Osborne.

Inactivation, purification and stability of 146 S antigens of FMD virus for use as reagents in the complement fixation test.

Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. (1984) 3 (2), 339-350.

20. F. Solyom, M. Szent - Ivanyi and F. Deak.
Evaluation of Waldmann-type and Frenkel-type FMD vaccines in pigs.
Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. (1984) 3 (2), 351-167.
21. O. Ouchterlony.
Antigen-antibody reactions in gels.
Arkiv Kemi-Mineral. Geol. (1948) 26B, 1-9.
22. K.M. Cowan and J.H. Graves.
A third antigenic component associated with FMD infection.
Virology (1966) 30, 528-540.
23. J. Polatnick and R.B. Arlinghaus.
FMD virus-induced RNA polymerase in baby hamster kidney cells.
Virology (1967) 31, 601-608.
24. J.W. Mc Vicar and P. Suttmöller.
FMD : The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys.
Am. J. Epidemiol. (1970) 92, 273-278.
25. C.A. Lobo, A. Gutierrez et O.C. Marino.
Evaluation d'anticorps induits par infection par le virus de la fièvre aphteuse.
Bull. Off. Int. Epizoot. (1974) 81 (3-4), 287-303.
26. A.A. Fernandez, P.A. DeMello, I. Gomez and F. Rosenberg.
The use of "virus-infection-associated" (VIA) antigens in the detection of cattle exposed to FMD virus.
Bol. Centro Panam. Fiebre Aftosa (1975) 17-22.

27. C.A. Lobo, R.P. Hanson, A. Gutierrez and L.E. Beltran.
Serological detection of natural FMD infection in cattle and pigs.
Bull. Off. Int. Epizoot. (1976) 85, 1075-1104.
28. P.S. Dawe and A.A. Pinto.
Antibody response to type specific and "virus infection associated" (VIA) antigens in cattle vaccinated with inactivated polyvalent FMD virus in Northern Malawi.
British Vet. J. (1978) 134, 504-511.
29. A.A. Pinto and A.J.M. Garland.
Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with FMD virus inactivated by formalin or acetylethylenimine.
J. Hyg. (Camb., 1979) 82, 41-49.
30. J. Polatnick and S.H. Wool.
Characterization of a 70 S polyuridylic acid polymerase isolated from FMD virus-infected cells.
J. Virol. (1981) 40 (3), 881-889.
31. M.H. Baron and D. Baltimore.
In vitro copying of viral positive strand RNA by poliovirus replicase. (Characterization of the reaction and its products).
J. Biol. Chem. (1982) 257, 12359-12366.
32. J. Polatnick and S.H. Wool.
Localization of FMD-RNA synthesis on newly formed cellular smooth membranous vacuoles.
Arch. Virol. (1982) 71, 207-215.

33. B.H. Robertson, D.O. Morgan, D.M. Moore, M.J. Grubman, J. Card, T. Fischer, G. Weddell, D. Dowbenko and D. Yansura.
Identification of amino acid and nucleotide sequence of the FMD virus RNA polymerase.
Virology (1983), 126, 614-623.
34. J. Polatnick and S.H. Wool.
Association of FMD virus induced RNA polymerase with host cell organelles.
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. (1983) 6 (3), 265-272.
35. A.A. Schudel, G. Palma Zuloaga, F. Fernandez, M.V. Borca y F.E. Marchovecchio.
Anticuerpos anti-VIA en animales susceptibles al virus de la fiebre aftosa.
Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. (1984) 3 (2), 329-337.
36. G. Kamer and P.A. Argos.
Primary structural comparison of RNA-dependant polymerases, from plant, animal and bacterial viruses.
Nucl. Acid. Res. (1984) 12, 7269-7281.
37. J. Polatnick.
Effect of salts and other agents on FMD virus poly(U) polymerase activity.
Arch. Virol. (1985) 84, 269-275.
38. H. Schaller, S. Forss, K. Strebel, H.O. Böhm, J. Leban and E. Pfaff.
FMD virus organisation, antigenic variation and new approaches to a safe vaccine.
Coll. Mosbach 1984, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1985.
39. R.S. Hedger.
The isolation and characterization of FMD virus from clinically normal herds in Botswana.
J. Hyg. (1968) 66, 37.

40. A.A. Pinto and R.S. Hedger.

The detection of antibody to Virus - Infection Associated (VIA) antigen in various species of african wildlife following natural and experimental infection with FMD virus.

Arch. Virol. (1978) 57, 307-314.

41. F. Zindel.

Serologische Untersuchungen über das Vorkommen und die Verbreitung bedingt pathogener Schweineviren in der Schweiz.

Inauguraldissertation Vet.-med. Fakultät, Universität Zürich (1980).

42. E. Eggenberger.

Graphische Datenanalyse : Anwendungen in der Tiermedizin.

Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für Biometrie an der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich (1985).

Verdankung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich recht herzlich danken, im Besonderen :

- Herrn Prof. Dr. R. Wyler, Institut für Virologie der Universität Zürich, für die Obhut sowie die zahlreichen Ratschläge zur Abfassung und Korrektur dieser Arbeit.
- Herrn Dr. H.K. Müller vom Eidg. Vakzine-Institut, Basel, der mir nebst der unermüdlichen Leitung dieser Arbeit noch den Eingang in der Virologie erleichterte.
- den Herren Dr. U. Kihm, Dr. L. Bruckner und Dr. M. Ackermann vom Eidg. Vakzine-Institut, Basel, die mir beim Lösen verschiedener Probleme beistanden, sowie allen anderen Institutsmitarbeiterinnen und -mitarbeitern für ihre wertvolle Mithilfe bei der Durchführung der Experimente.
- Den Tierärzten der Schlachthöfe Neuenburg und La Chaux-de-Fonds für die Blutentnahme sowie den Mitarbeitern der kantonalen Veterinärämter von Graubünden, St-Gallen und Thurgau und der Firma Veterinaria AG, Zürich, für die Zustellung von Seren.
- Herrn Dr. M. Eskildsen, State Veterinary Institute for Virus Research, Lindholm, Kalvehave (DK) für die Zusendung von 210 Rinderseren aus Dänemark.
- Der Firma Biogen SA, Genf, insbesondere Herrn Dr. H. Küpper und seinen Mitarbeitern, die das biotechnische VIA Ag hergestellt und uns kostenlos zu Verfügung gestellt haben.
- Der Firma Rhône Mérieux, Lyon (F), insbesondere Herrn Dr. M. Lombard und

seinen Mitarbeitern für die grosszügige Abgabe von Labormaterial und die guten Ratschläge zur Durchführung dieser Arbeit.

- Herrn Dr. J. Crowther und seinen Mitarbeitern, Animal Virus Research Institute, Pirbright (GB), für die prompte Durchführung von serologischen Untersuchungen sowie für die nützlichen Ratschläge zur ELISA Technik.
- Den Mitarbeitern des United State Department of Agriculture, Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New-York (USA), für die kostenlose Zustellung der Reagenzien für den Immundiffusionstest zum Nachweis von Ak gegen VIA Ag. "

Curriculum vitae

=====

Am 1. Januar 1959 wurde ich in Strassburg (F) als Sohn des Bierbrauers Walter VILLINGER und der Evelyn, geb. LIX geboren.

In Saverne (F) besuchte ich die Primar- und Sekundarschule. Im Juni 1977 erwarb ich dann das französische Baccalauréat Typ C und im darauffolgenden Jahr die schweizerische Maturität des gleichen Typs. Im Herbst 1978 begann ich an der Universität von Lausanne das Studium der Veterinärmedizin; dieses wurde 1979 an der Universität Zurich fortgesetzt und im Frühjahr 1984 mit dem Staatsexamen abgeschlossen.

Seit dem 1. Mai 1984 bin ich am Eidgenössischen Vakzine-Institut in Basel tätig.

Seren Ent- nahmedatum	Januar - Februar			März - April			Mai - Juni			Juli - August			September - Oktober			November - Dezember		
	N	SN-Mediantiter Typ		N	SN-Mediantiter Typ		N	SN-Mediantiter Typ		N	SN-Mediantiter Typ		N	SN-Mediantiter Typ		N	SN-Mediantiter Typ	
		O	A C		O	A C		O	A C		O	A C		O	A C		O	A C
0																244	0.60	0.48 0.48
1	88	0.85	0.70 0.70	42	1.67	1.08 1.30	56	1.08	0.95 1.18	31	0.95	0.70 1.08	50	0.95	0.70 0.48	181	0.00	0.60 0.48
2	130	1.30	0.95 0.95	89	1.91	1.18 1.67	47	1.79	1.18 1.54	21	1.54	1.08 1.18	70	1.30	0.70 0.70	324	1.08	0.85 0.95
3 - 4	177	1.30	1.08 1.43	47	2.27	1.54 1.91	33	1.91	1.30 1.67	17	1.43	0.95 1.18	41	1.54	0.85 0.70	561	1.43	1.08 1.18
5 - 17	155	1.67	1.18 1.54	42	2.39	1.43 1.91	31	2.03	1.18 1.54	22	1.79	0.95 1.54	45	1.79	1.18 1.30	429	1.54	1.08 1.54

Tab. 7 : Logarithmus der Mediantiter neutralisierender Antikörper (SN-Titer) gegen Maul- und Klauenseuche Viren Serotypen O, A und C bei 2973 Schweizerindern, die nicht oder bis 17 mal geimpft wurden. Die Seren wurden im Jahr 1984 entnommen.
N = Anzahl untersuchte Seren pro Gruppe.

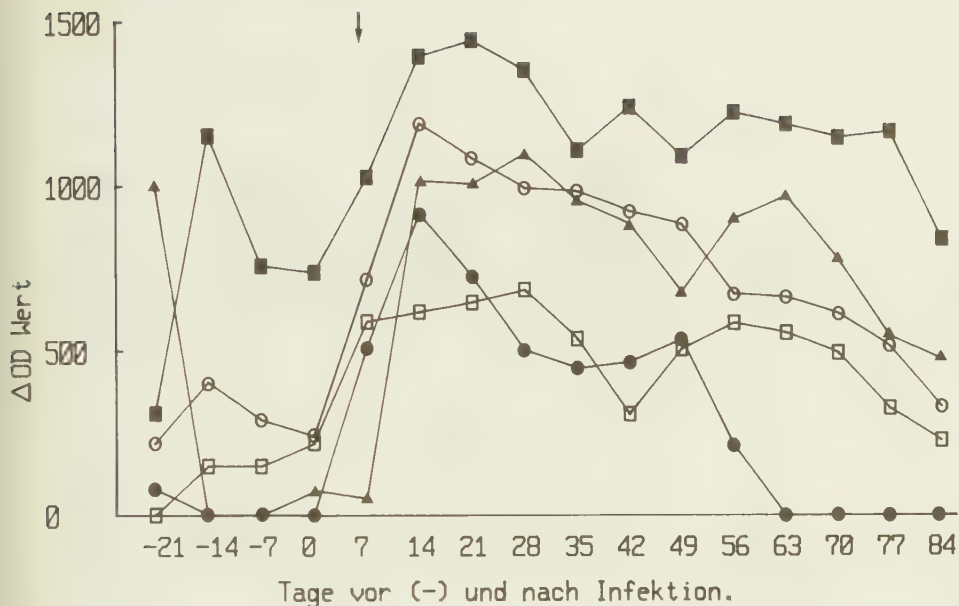


Abb. 1 : Antikörpertiterverlauf gegen VIA-Antigen bei 5 ungeimpften dänischen Rindern vor und nach einer intradermolingualen Infektion mit Maul- und Klauenseuche Virus Typ A 5. Die Antikörpertiter wurden mittels ELISA nachgewiesen.

○: Tier Nr. 8033, ●: Tier Nr. 8037, □: Tier Nr. 8042, ■: Tier Nr. 8032, ▲: Tier Nr. 8041. ↓ Auftreten von VIA präzipitierenden Antikörpern sowie von MKS Typ A 5 Virus neutralisierenden Antikörpern.

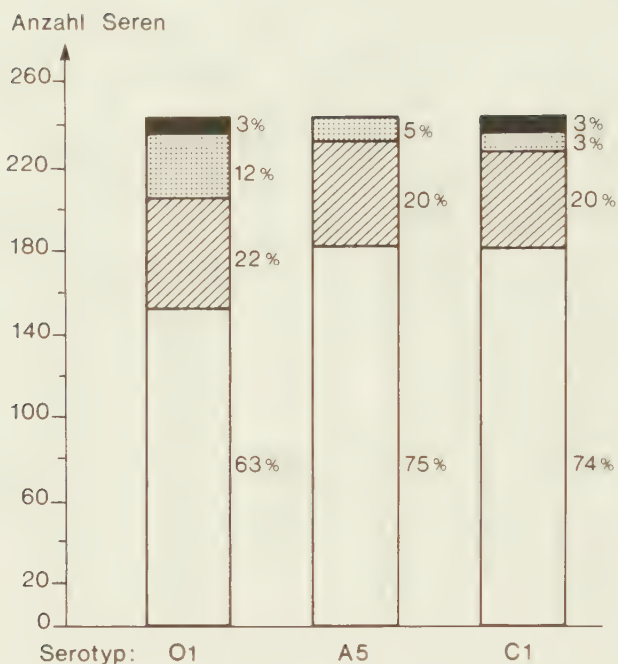


Abb. 2 : Prozentsatz seropositiver Kälber im SN, wobei auf Antikörper gegen Serotyp O1, A5 und C1 des MKSV getestet wurde. Es handelte sich um Tiere, die nicht geimpft waren und 1984 geboren wurden. Das Alter der Tiere lag zwischen einer Woche und einem Jahr, die Serumentnahme erfolgte in den Monaten November 1984 bis Januar 1985, d.h. mindestens 6 und höchstens 23 Monate nach Impfung des Muttertieres.

Ak - Titer : ≤ 0.7 , $0.8 - 1.3$, $1.4 - 1.9$, >1.9 .

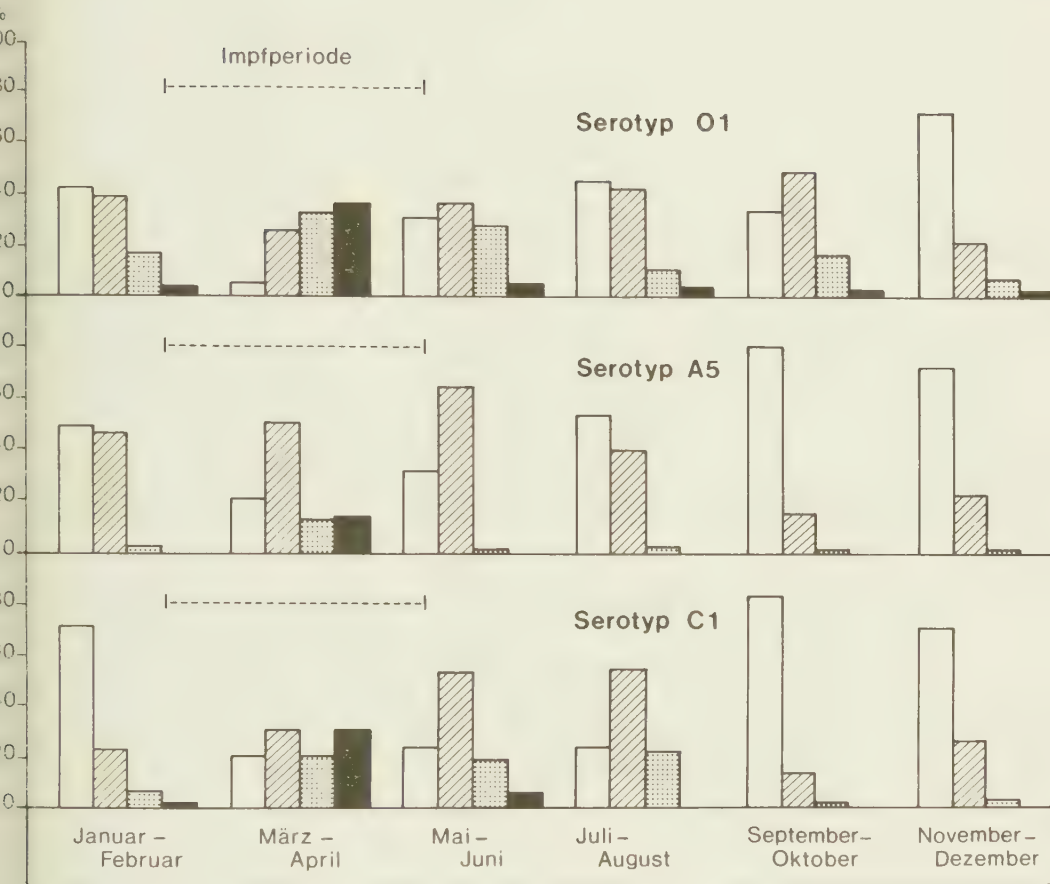
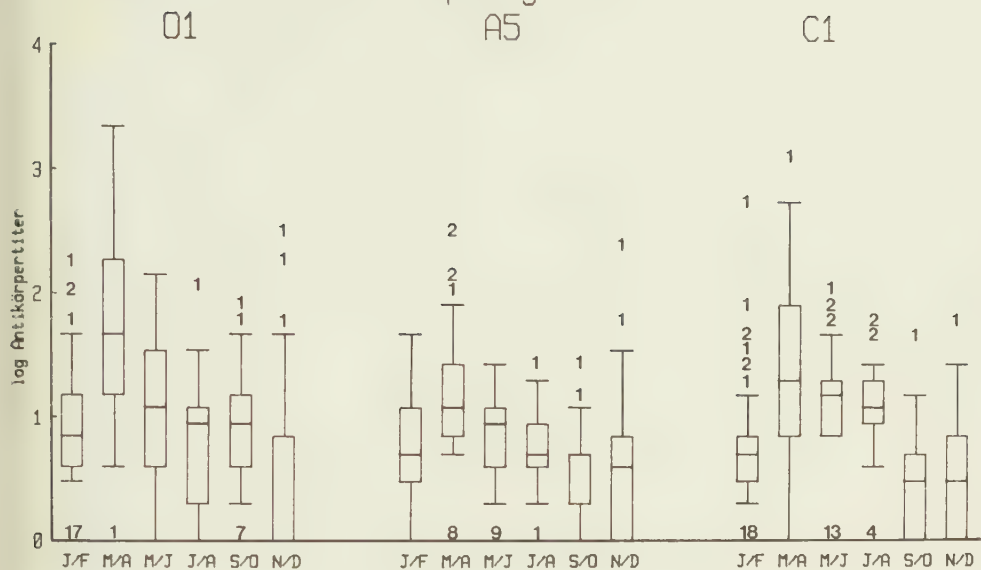


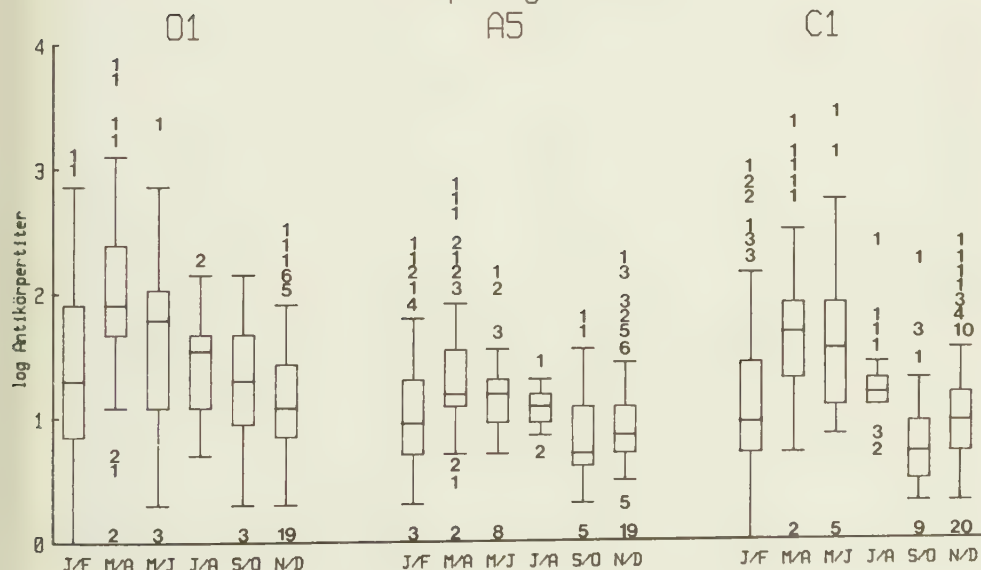
Abb. 3 : Prozentsatz der Seren mit und ohne neutralisierenden Antikörpern gegen Serotyp O1, A5 und C1 nach einmaliger Impfung. Ak-Titer : $\square \leq 0.7$, $\square \text{ mit } \diagup 0.8 - 1.3$, $\square \text{ mit } \dots 1.4 - 1.9$, $\blacksquare > 1.9$. Die Impfung erfolgte zwischen dem 15. Februar und dem 15. Mai. Die im Januar und Februar aufgeführten Tiere wurden im Vorjahr geimpft.

Abb. 4 : Titer der neutralisierenden Antikörper gegen Maul- und Klauenseuche Virus Serotyp O1, A5 und C1 in Abhängigkeit von der Anzahl Impfungen und dem Zeitpunkt der Blutentnahme innert einem Jahr. Die Darstellung erfolgt im Boxplot Verfahren, wobei für jede Entnahmeperiode der Mediantiter (Logarithmus), das 25 und 75 % Quartil sowie die Extremwerte angegeben sind. Titer bis 0.7 werden als negativ beurteilt (9,14).

1 Impfung A5



2 Impfungen A5

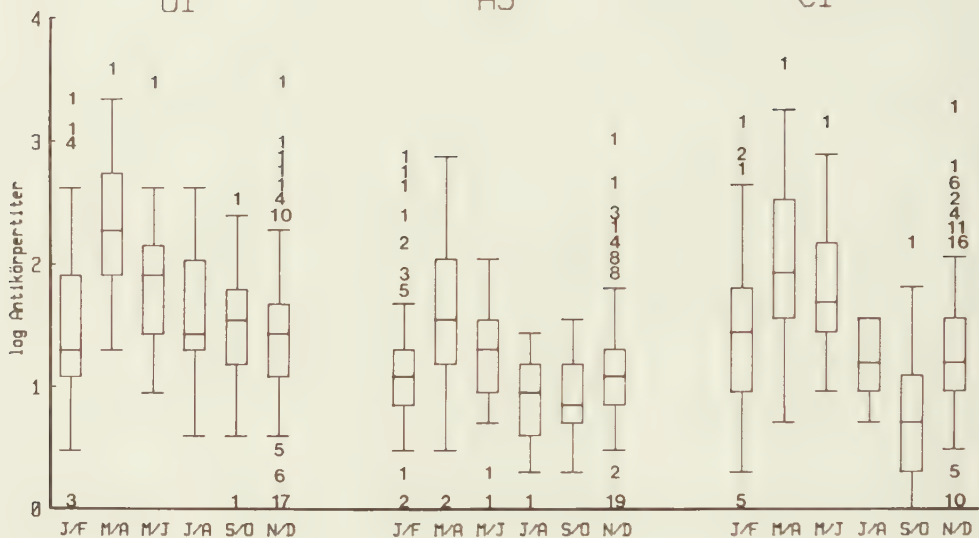


3 - 4 Impfungen

O1

A5

C1



5 - 17 Impfungen

O1

A5

C1

